

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09303

研究課題名（和文）メラトニン欠乏に起因した側弯症の病態解明：原因候補遺伝子Tbx1との機能解析

研究課題名（英文）Pathophysiology of scoliosis caused by melatonin deficiency: functional analysis with a candidate causative gene, Tbx1

研究代表者

河村 一郎 (Kawamura, Ichiro)

鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・助教

研究者番号：90535832

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：メラトニン経路の下流で側弯に至る機序を解明するため、ゲノムワイド関連解析（GWAS）でTbx1遺伝子をin vitroで調査したが、骨、軟骨、筋分化への影響は微弱だった。そこで、松果体と関連するSCO-spondin (Sspo) とUTS2Rの解析に注目した。UrotensinとUTS2R阻害剤、siRNAを用いた実験で、UTS2Rが筋分化に関与することを確認した。さらに、UTS2Rのin vivo表現型を確認するため、UTS2Rノックアウトマウスを作成したが、筋骨格系の明らかな表現型の違いは見られず、UTS2R単独では脊柱変形のみを説明できなかった。他の経路との複合的関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

思春期特発性側弯症は小児の約2%に発症し、その原因や機序は未解明であるが、左右の傍脊柱筋も原因の1つとされている。ゲノムワイド関連解析で指摘されたTbx1遺伝子や、動物モデルで側弯症が発生することが確認されたSspo、さらにその下流で筋に発現するUTS2Rとの関係を解析した。UTS2Rが筋細胞の分化と関連することはわかったが、動物モデル解析ではUTS2R単独で側弯症を引き起こす要因にはなりえなかった。しかしながら、これらを解明することにより、特に脊柱左右の筋制御に関与する分子メカニズム異常による側弯症の発生病態を明らかにし、新たな治療選択や進行予測に繋がる可能性が考えられる。

研究成果の概要（英文）：To investigate the mechanisms leading to scoliosis downstream of the melatonin pathway, we investigated the Tbx1 gene in vitro by genome-wide association analysis (GWAS), but its effects on bone, cartilage, and muscle differentiation were weak. Therefore, we focused on the analysis of SCO-spondin (Sspo) and UTS2R, which are associated with the pineal gland; experiments using Urotensin, UTS2R inhibitors, and siRNA confirmed that UTS2R is involved in muscle differentiation. Furthermore, to confirm the in vivo phenotype of UTS2R, UTS2R knockout mice were generated, but no obvious phenotypic differences in the musculoskeletal system were observed, and UTS2R alone could not explain the mechanism of spinal deformity. Combined involvement with other pathways was suggested.

研究分野：脊椎

キーワード：側弯症 神経筋原性 メラトニン

1. 研究開始当初の背景

思春期特発性側弯症(AIS)は、小児の2%程度の発症とされているが、未だ原因や脊柱変形の機序が特定できていない。病因としてはこれまで、遺伝子やホルモン異常、コラーゲン異常などが研究されているが、単一で説明しうるものではなく、メンデル遺伝病でもない為、複合的な要素が存在すると考えられている。また、骨・椎間板や筋肉、神経の発育異常など側弯という表現型を引き起こす責任器官も特定できていない。AIS発症メカニズム関連の研究として、松果体切除動物による側弯モデル、前肢切除 bipedal マウスモデルや C57BL/6J 側弯モデルマウスなどがあり、メラトニン投与により側弯発症・進行が抑えられることが報告されている。加えて、メラトニン antagonist 投与モデルにより側弯進行が認められることから、メラトニンを key factor としたカスケードが考えられる。また、AIS患者における、血清メラトニン濃度と進行予測、及びメラトニン投与による進行抑制の報告など、側弯とメラトニンの関与が疑われてきた。しかしながら、実際メラトニンが側弯に対してどのような機序で関与しているかは明らかではない。これらを明らかにすることにより、AISのうち脊柱左右の筋トーンスを制御する分子メカニズム異常によるAISのサブタイプが明らかとなり、側弯進行予測や治療選択に新たな知見をもたらされる可能性がある。

2. 研究の目的

メラトニン発現は幼児期をピークとし、以後内因性発現は減少していくため、思春期に性腺刺激ホルモンと関与し、それが女兒に多い原因である可能性も考えられる。症候群性側弯症に分類される側弯症の中で、ミオパチーや筋ジストロフィーに起因する筋原性側弯はすでに定義されているため、“特発性”に分類されている側弯症の中にも筋原性に起因するものがあると考えられる。実際にAISでは傍脊柱筋の張力の不均等が報告されている。またAIS患者の傍脊柱筋におけるメラトニン受容体の関連や、メラトニンが Wnt/ β -catenin 経路を抑制し、筋芽細胞 C2C12 の分化を抑制する報告など、筋分化異常の関連も示唆されている。一方本邦における大規模ゲノムワイド関連解析(GWAS)においてTBX1 遺伝子がAISの候補遺伝子と同定されたこと、さらに、Tbx1 遺伝子は筋分化を促進し、筋肉の速筋と遅筋を選別する遺伝子であることが近年続々と報告されている。そこで我々はAISの発症および進行因子として、メラトニンを起点としたTBX1 シグナルを介する筋原性の可能性に着目した。メラトニンとTbx1を直接結び付けるエビデンスはない。AISとして一塊に分類されている集団の中に、メラトニンを介したTbx1 遺伝子もしくはその下流因子による、筋原性を病態としている側弯症が存在する可能性があると考え、それらの病態を明らかにすることが目的である

3. 研究の方法

仮説：メラトニンは筋細胞においてTbx1の発現にどう影響するか

C57BL/6J マウス脊柱筋より採取した初代筋細胞および筋芽細胞株 C2C12 細胞を用いて、馬血清(HS)濃度削減による分化誘導過程におけるTbx1 及び筋分化マーカー(MyoD、Myf5、Myf7、Myogenin、Mrf4、Mef2、Pax7 など)の mRNA および蛋白レベルでの発現を定量的 RT-PCR やウエスタンブロッティング法、免疫染色を用いて解析する。この系においてメラトニンを添加によるTbx1 発現の挙動を調べ、分化マーカーとの相互関係を調べる。メラトニンと受容体 MT1/2 の下流では、Wnt シグナルの抑制に加えて、JNK や p44/42 などの MAPK、PI3K-Akt 経路活性化に働くことがわかっており、後者の場合 S6 蛋白を介して翻訳レベルで TBX1 蛋白の発現に影響する可能性があり、mRNA と蛋白の発現レベルの乖離にも留意する。また筋細胞分化抑制シグナルとしてもよく知られる TGF- β /BMP シグナルも、古典的 Smad 経路以外に同様の側副経路を活性化するため、その相互作用によりTbx1 発現が影響される可能性も十分あり、TGF- β /BMP リガンドも加えて効果を観る。メラトニンが報告どおりに筋芽細胞分化を抑制する場合、Tbx1 のアデノ随伴ウイルスを用いた過剰発現や siRNA ノックダウン、不十分なら CRISPR/Cas9 ノックアウトにより増強やレスキューが観られるか検証する。一方、興味深い事に、Tbx1 は Smad4 を競合する事で BMP シグナルを抑制する事、またTbx1 cKO マウスの毛根では Bmp2 発現増加と BMP シグナル亢進が見られる事から、BMP シグナルを抑制する事で筋分化を促進する可能性も十分あり、BMP シグナル構成因子との絡みも合わせて評価したい。

仮説：bipedal C57BL/6J 側弯モデルの側弯頂椎の concave と convex 側では筋のTbx1 発現が異なる

C57BL/6J マウスはメラトニン変換酵素遺伝子異常があり、メラトニン欠失マウスと考えられる。前肢切除 bipedal C57BL/6J 側弯モデルにメラトニン投与することで、側弯の進行が抑えられていることの報告はあるが、傍脊柱筋の解析はない。Bipedal C57BL/6J 側弯モデルと肢切除なし(quadrupedal)マウス間、また bipedal C57BL/6J 側弯モデルにメラトニンを投与(10mg/kg oral chow)した群との間における傍脊柱筋の concave と convex 側におけるメラトニンおよびTbx1 の発現を定量的 RT-PCR 法で、また蛋白レベルでの発現をウエスタンブロットおよび免疫染色で解

析する。組織における mRNA や蛋白は、傍脊柱筋（内側筋群：多裂筋、胸長・短回旋筋、外側筋群：最長筋、棘筋）を切除し解析する。免疫染色においては、脊柱および傍脊柱筋の横断面組織を解析する。bipedal C57BL/6J 側弯モデルの画像評価は、動物施設内の軟線 X 線解析装置により解析する。

Tbx1 と傍脊柱筋の組成（速筋・遅筋）の不均等および側弯形成のメカニズムの解明

仮説：Tbx1 により傍脊柱筋において速筋・遅筋が選別され、側弯発症に関与する

AIS では concave および convex 側における速筋/遅筋の比率が異なるとの報告がある点、また Tbx1 発現は速筋で増加し、Tbx1 が速筋・遅筋の選別因子と示唆する報告がある。Bipedal C57BL/6J 側弯モデル頂椎周囲の傍脊柱筋における、Pax1/7 陽性の筋衛星細胞およびミオシン重鎖 (MyHC) を解析する。遅筋では速筋に比べ筋衛星細胞が多く存在し、ミオシン重鎖のアイソフォームである MyHC type-1 は遅筋の筋管に発現していることが分かっており、速筋と遅筋の判別においては、筋衛星細胞のマーカーとして Pax 1 /7、また MyHC type-1 のマーカーである Myh7 を用いる。頂椎付近における速筋・遅筋の局在とメラトニン受容体や Tbx1 の発現の関連を定量的 PT-PCR 法を用いた解析や in situ hybridization を用い、また蛋白レベルでの発現をウエスタンブロットおよび免疫染色で解析する。Tbx1 の機能解析として、アデノ随伴ウイルスを傍脊柱筋に注入し、組成不均等が生じ、側弯形成を促進するか解析する。

仮説：SCO-spondin の下流で UTS2R が傍脊柱筋の分化を制御し、神経筋原性の側弯症を引き起こしている。Tbx1 発現が筋分化において微弱であることから、SCO-spondin (Sspo) とその下流の筋分化に挙動がある UTS2R とマウスにおける側弯症の発症の関連を解析した。つまり UTS2R loss of function と上記筋分化と側弯形成の関連を UTS2R knock out mice で解析する。

4. 研究成果

メラトニンより下流の経路でどのように側弯に至るのかの機序を解明すべく、ゲノムワイド関連解析 (GWAS) で候補となった Tbx1 遺伝子の関連をまず in vitro で確認したが、骨、軟骨および筋分化における内因性的変化が微弱な事から、Tbx1 の役割は限定的であると判断した。

メラトニン産生に関する内分泌器官である松果体との結びつきに注目し、SCO-spondin (Sspo) とその下流の筋分化に挙動がある UTS2R の解析に着目した。UTS2R と骨格筋の分化する過程の影響を評価するため、Urotensin および UTS2R の阻害剤、Uts2r siRNA を用い、その分化表現型を Real time PCR と免疫染色を用いて確認した。阻害剤により速筋マーカーである Myf1 と遅筋の Myf7 はともに抑制され、siUts2r を用いた loss of function 実験でも阻害剤実験同様 Myf1 と遅筋 Myf7 はともに抑制されたことより、in vitro における UTS2R と筋分化の関与が解析できた。

さらに UTS2R の in vivo での表現型を確認するために、UTS2R knock out mice (UTS2R^{-/-}) を作成し、脊柱変形とその発生メカニズムの解析を行った。UTS2R^{-/-} を 5、8 および 10 週で外観の変形と単純 X 線写真で脊柱変形を評価したが、Wild type mice と比較し明らかな脊柱変形含め筋骨格における明らかな表現型の違いや再現性は認められず、UTS2R 単独では脊柱変形発生のメカニズムは説明できなかった。各骨格筋組織、骨・軟骨・筋肉に表現型が認める場合には、Conditional knock out mice の作成も検討したが、まずターゲットとする脊柱変形の表現型を認めなかったため作成しなかった。メラトニン産生に関与する内分泌器官である松果体、その下流で脊柱変形との関連が報告されている Sspo のさらに下流には、UTS2R と他の経路との複合関与も考えられた。今後 Sspo が脊柱変形に関与する経路のうち、UTS2R とも相互的に関与する因子の検討していく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 俵積田裕紀、増田裕介、富永博之、河村一郎、前田真吾、谷口昇
2. 発表標題 オステオサルコペニアに関連する新たなマイオカインの検索
3. 学会等名 第52回日本脊椎脊髄病学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	前田 真吾 (Maeda Shingo) (60353463)	鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任教授 (17701)	
研究分担者	谷口 昇 (Taniguchi Noboru) (20626866)	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授 (17701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------